

■受領No.1415

## チロシンリン酸化に着目した敗血症の病態解明と新規治療法の開発

代表研究者

松本 佳則

岡山大学学術研究院医歯薬学域 腎・免疫・内分泌代謝内科学 研究准教授



### Investigation of mechanistic insights into the roles of kinases for inflammation

Principal Researcher

Yoshinori Matsumoto,

Department of Nephrology, Rheumatology, Endocrinology and Metabolism, Okayama University Faculty of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences Research Associate Professor

敗血症は外来抗原に対する異常な免疫応答により活性化された炎症細胞からサイトカインが異常産生されることで生じるが、その発症機序は不明である。TLR (Toll-like receptor: Toll 様受容体) は自然免疫制御、サイトカイン産生に不可欠の受容体で、様々な抗原による TLR シグナルの異常活性化は敗血症など難治性炎症疾患の病因となることが知られているが、TLR の制御機構や TLR が病態形成に関与する分子生物学的機序は不明である。本研究では炎症発生に関わる 3BP2 が、敗血症の原因となる TLR 異常活性化に関わる分子生物学的メカニズムを明らかにする。

Abnormal innate immune response to commensal pathogens with subsequent excessive cytokine and chemokine production is considered to be a pathogenesis of autoinflammatory disorders. However, the regulatory mechanism of host responsiveness to bacterial pathogens during development of autoinflammation is not fully elucidated. In the present study, we have provided mechanistic evidence of how Tankyrase, a member of the poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) family, negatively regulates Toll receptor signaling.

#### 1. 研究背景・目的

敗血症性ショック (エンドトキシンショック) は、外来抗原に対する異常な免疫応答により活性化された炎症細胞からサイトカインが異常産生されることで生じるが、その発症機序は不明である。抗生物質の他は保存的加療が中心で、未だ有効な治療法も確立されていない。TLR (Toll-like receptor: Toll 様受容体) は自然免疫制御、サイトカイン産生に不可欠の受容体で、様々な抗原による TLR シグナルの異常活性化は敗血症性ショックなど難治性炎症疾患の病因となることが知られているが、TLR の制御機構や TLR が病態形成

に関与する分子生物学的機序は不明である。

“SH3BP2(3BP2)”は pleckstrin homology (PH) ドメインの他、Src homology 3 (SH3) ドメイン含有タンパクに結合するプロリンリッチ領域や、リン酸化チロシンに結合する SH2 ドメインを有し、受容体と細胞内シグナルを仲介するチロシンキナーゼのアダプタータンパクである。2001 年に 3BP2 のミスセンス変異が、顔面骨の炎症性骨破壊、歯牙の脱落を特徴とする希少遺伝性骨疾患“チェルビズム”の原因であることが報告された。その後、トロント大学の Prof. Rottapel 研究室は 3BP2 が poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) メンバ

ーである“Tankyrase”に結合して ADP リボシル化された部位に、E3-ubiquitin ligase の RNF146 が結合し、3BP2 をユビキチン化、分解する経路を発見した。更にチェルビズム変異 3BP2 は Tankyrase に結合出来ず、その結果生じた 3BP2 の代謝障害で蓄積した 3BP2 が破骨細胞を異常活性化し、骨破壊をきたすチェルビズムの発症機序を解明した。そこで我々は、正常な 3BP2 代謝が恒常性維持に重要と考え、3BP2 代謝に関わる因子の生体内機能を明らかにしてきた。まず 3BP2 の別の基質蛋白である ABL に着目し、3BP2 により活性化した ABL が骨芽細胞の必須転写因子である RUNX2 の転写活性を高めることで、骨芽細胞の分化を促進する機序を報告した。更に RNF146 をマクロファージでノックアウトしたマウスを作製し、同マウスが破骨細胞の異常活性化による骨粗鬆症を呈することを明らかにした他、RNF146 の骨芽細胞でのノックアウトマウスも作製し、これらの新生児は致死的な頭蓋骨欠損や肺胞形成障害を呈することも報告した。本研究では、Tankyrase-3BP2 分解経路に着目し、炎症発生に関わる 3BP2 が、敗血症の原因となる TLR 異常活性化に関わる分子生物学的メカニズムを明らかにする。

## 2. 研究内容

### 2.1 TLR2 チロシンリン酸化が TLR 活性を制御する

それでは 3BP2 はどの様に炎症を惹起するのか? その疑問を明らかにするために、サイトカイン産生に重要なマクロファージの TLR シグナル経路に着目して検討を進めた。3BP2 はチロシンキナーゼのアダプター蛋白であるため、我々は TLR チロシンリン酸化がシグナル活性化のカギになるのではないかと考えた。TLR2 は膜貫通蛋白で、病原体を認識する細胞外領域、膜貫通領域及びシグナル伝達に関わる細胞内領域から成る。まず我々は、チロシンキナーゼである SRC/Syk が TLR2 のチロシン残基をリン酸化し、TLR2 の NF- $\kappa$ B 活性を亢進させることを証明した(図1)。次

に我々はシグナル伝達に関わると予測される6つの細胞内チロシン(Y616-Y761)に着目し、6チロシン全てをフェニルアラニンに置換した TLR2 (6Y $\rightarrow$ F) プラスミドを作製した。これを 293T 細胞に発現させて、SRC/Syk による NF- $\kappa$ B 活性を検討したところ、TLR2 (6Y $\rightarrow$ F) は完全に NF- $\kappa$ B 活性が失われ、SRC/Syk 存在下でも活性化しなかった。

### 2.2 TLR2 (Y647) が TLR2 活性化に関与する

それでは TLR2 の6つのYのうちどれがシグナル伝達に重要なのか? TLR2 (6Y $\rightarrow$ F) プラスミドのフェニルアラニン1つをチロシンに Add back して6つのプラスミド(F616Y、F641Y、F647Y、F653Y、F715Y、F761Y)を作製し、293T 細胞で NF- $\kappa$ B 活性の検討を行ったところ、TLR2(F647Y) がシグナル活性をレスキューさせることを見出した(図2)。

### 2.3 Tankyrase KO マウスはサイトカインストームを起こす

TLR2 リン酸化及びシグナル活性化の過程で、3BP2 はどの様な役割を果たすのか? その疑問を明らかにするため、Tankyrase をマクロファージ分画でノックアウト(KO)したマウス(*Tnks*<sup>-/-</sup>*Tnks2*<sup>fl/fl</sup>*LysM-Cre*)を作製した。その結果、Tankyrase KO マウスは細胞内 3BP2 が増加し、TNF- $\alpha$ をはじめとする炎症性サイトカインの産生亢進によるサイトカインストームを起こし、炎症細胞の多臓器浸潤から敗血症と同様の病態を呈した(図3)。

### 2.4 Tankyrase KO 細胞は TLR2 リガンドへの感受性が亢進する

Tankyrase KO マウスの骨髓より分離したマクロファージを、TLR2 のリガンドであるバクテリア由来の抗原(Heat Killed *Porphyromonas gingivalis*; HKPG)で刺激して、サイトカインの

mRNA 発現量を検討したところ、KO マクロファージはこれらのリガンド刺激により WT と比べて有意にサイトカイン産生が亢進し、3BP2 は TLR の感受性を高めることが示唆された (図 4)。

MF, Chruscinski A, He F, Asano Y, Katsuyama T, Sada KE, Wada J, Rottapel R. Tankyrase represses autoinflammation through the attenuation of TLR2 signaling. *The Journal of Clinical Investigation*. 132(7):e140869, 2022

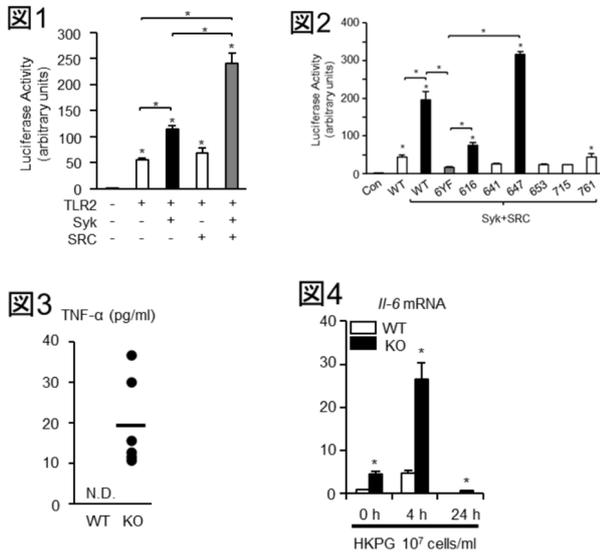


図 1,2：293T 細胞を用いた NF- $\kappa$ B ルシフェラーゼアッセイ。

図 3：野生型 (WT) と Tankyrase KO マウスの血清中 TNF- $\alpha$  濃度。

図 4：野生型 (WT) と Tankyrase KO マウスマクロファージを HKPG で刺激し、0-24 時間で回収した細胞の Il6 mRNA 発現量の解析。

### 3. 今後の展開

本研究では、Tankyrase、3BP2 により制御される TLR チロシンリン酸化という新しい概念から自然免疫、サイトカイン産生、炎症に関わる TLR シグナル経路の新たな制御機構を明らかにした。本研究の最終目標は、敗血症の病態改善を可能にする新規薬剤の開発である。本研究を更に深化させ、敗血症に応用可能な薬剤の開発に取り組んでいる。本研究のご支援を頂きました日立財団の皆様方に感謝申し上げます。

### 2. 発表 (研究成果の発表)

Matsumoto Y, Dimitriou ID, La Rose J, Lim M, Camilleri S, Law N, Adissu HA, Tong J, Moran